

Λεκανίδης Στέφανος

Ποταμίτης-Κόμης Ελευθέριος

# **ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ & ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΧΟΝΔΡΟΥ**

# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ (ΟΡΙΣΜΟΣ)

---

- ✖ Η ιστολογία είναι η επιστημονική μελέτη των ιστών του σώματος και του τρόπου με τον οποίο αυτοί συμβάλουν ώστε να σχηματιστούν τα όργανα.
  
- ✖ Τυπικά συστήματα οργάνων που συγκροτούνται από ιστούς :
  - + Αναπνευστικό
  - + Νευρικό
  - + Καρδιαγγειακό
  - + Πεπτικό
  - + Ανοσοποιητικό (μυελός των οστών)
  - + Μυϊκό
  - + Αναπαραγωγικό

# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ (ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ)

- ✖ Γαληνός : διέκρινε πρώτος τη διαφορετικότητα κατασκευής των ιστών των οργανισμών
- ✖ 1628-1694 : Μάρκελος Μαλπίγκι εισήγαγε το μικροσκόπιο στη μελέτη των ζωικών οργάνων
- ✖ 1771-1802 : Φρανσουά Μπισά θέσπισε τον όρο 'ιστός'
- ✖ 1825 : Χούντερ ανακάλυψε τον πυρήνα αιμοσφαιρίων
- ✖ 1773-1858 : Ρομπερτ Μπράουν περιέγραψε τον πυρήνα του φυτικού κυττάρου
- ✖ 1838 : Μ. Σλάιντερ ολοκλήρωσε τη μελέτη του φυτικού ιστού
- ✖ 1839 : Σβαν ολοκλήρωσε τη μελέτη του ζωικού ιστού

# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ (ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ)

---

- ✖ Μονιμοποίηση : Αποφυγή της πέψης του ιστού από τα ένζυμα και τα βακτήρια
  - + Χημική
  - + Φυσική
- ✖ Επεξεργασία ιστού : Σκλήρυνση ιστού
- ✖ Τομή
- ✖ Χρώση : διάκριση διαφορετικών συστατικών του ιστού



# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (ΧΗΜΙΚΗ)

- ✖ Μονιμοποιητικά :
  - + Φορμαλδεΰδη (4%)
  - + Αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη)
  - + Γλουταραλδεΰδη
  - + Άλατα υδραργύρου : B-5
  - + Boulin's Solution
  
- ✖ Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μονιμοποίηση:
  - + pH (7)
  - + Διαπερατότητα ιστού
  - + Όγκος μονιμοποιητικού (10/1)
  - + Θερμοκρασία
  - + Συγκέντρωση του μονιμοποιητικού
  - + Χρονική διάρκεια από την δειγματοληψία ως τη μονιμοποίηση.

# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (ΦΥΣΙΚΗ)

- ✖ Μονιμοποίηση του ιστού με ψύξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου σκληραίνει και είναι δυνατή η τομή του στον ειδικό μικροτόμο που λέγεται κρυοστάτης
- ✖ Χρησιμοποιείται στα νοσοκομεία κατά τη διάρκεια χειρουργίων για ταχεία μελέτη των ιστών

# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ – ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΟΥ

- ✖ Η επεξεργασία ιστού χωρίζεται σε 4 βήματα
  - + 1<sup>ο</sup> Βήμα : Αφυδάτωση σε διαλύματα αιθανόλης
  - + 2<sup>ο</sup> Βήμα : Διαύγαση
    - ✖ Διαπότιση του ιστού με διαλύτη (Ξυλόλη)
  - + 3<sup>ο</sup> Βήμα : Σκλήνωση
    - ✖ Τοποθέτηση του ιστού στο υλικό έγκλεισης
    - ✖ Τοποθέτηση σε κλίβανο (50<sup>ο</sup>-60<sup>ο</sup>C)
  - + 4<sup>ο</sup> Βήμα : Έγκλειση
    - ✖ Τοποθέτηση σε κασέτες έγκλεισης



# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ - ΤΟΜΗ

## ✕ Μικροτόμος

- ✕ Τομές πάχους από  $1\mu\text{m}$  έως  $10\mu\text{m}$
- ✕ Τοποθέτηση των τομών στο λουτρό θερμοκρασίας  $50^{\circ}\text{C}$  –  $60^{\circ}\text{C}$  και ψαρεμά τους με αντικειμενοφόρες πλάκες





# ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ - ΧΡΩΣΗ

- ✖ Οι χρωστικές ουσίες χωρίζονται σε όξινες και βασικές

Συνήθεις χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην ιστολογία (Από Κοντόπουλος, 1980)

Τεχνικές	Στοιχεία	Πυρήνας	Κυτόπλασμα	Κολλαγόνο	Ελαστικές ίνες	Δικτυωτές ίνες
A και H	Αιματοξυλίνη & Ηωσίνη	Σκούρος γαλάζιος Μαύρος	Ρόδινο	Ρόδινο	Ακανόνιστα	---
Τρίχρωμη χρώση Masson	Σιδηρούχα αιματοξυλίνη, όξινη φουξίνη, Roussau 2R, ανοικτό πράσινο		Κόκκινο	Πράσινο	---	Πράσινες
Ελαστική χρώση Weigert	Ρεσορκίνη, φουξίνη, HCl, αιματοξυλίνη, πικρικό οξύ, Roussau, πυκνό οξεικό οξύ	Φαιός	Κίτρινο	Κόκκινο	Μαύρες	---
Διαποτισμός με άργυρο	Διάλυμα άλατος αργύρου	---	---	Σκούρο καφέ	---	Μαύρες

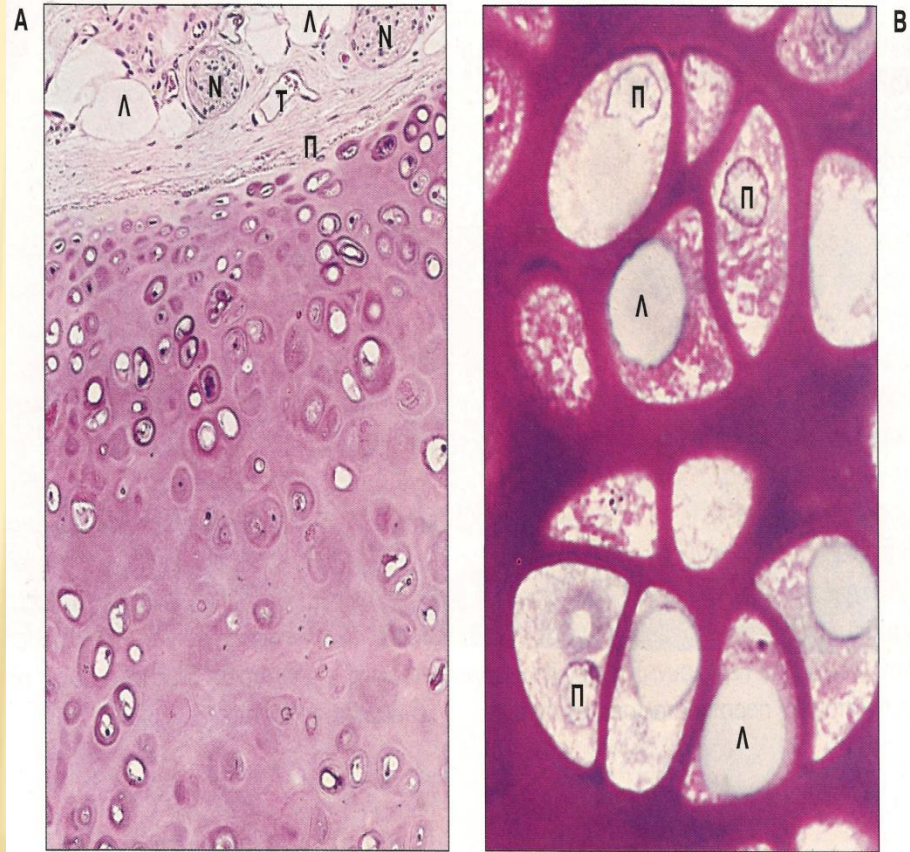
# ΧΟΝΔΡΟΣ

---

- ✖ Ο χόνδρος είναι ένα ημίσκληρο είδος στηρικτικού ιστού, τα χαρακτηριστικά του οποίου πηγάζουν κυρίως από τη φύση και την αφθονία της θεμέλιας ουσίας στον εξωκυτταρικό χώρο.
- ✖ Τρείς είναι οι κύριες μορφές του χόνδρου :
  - + Ο υαλοειδής χόνδρος
  - + Ο Ινώδης χόνδρος
  - + Ο ελαστικός χόνδρος
- ✖ Η αύξηση του ώριμου χόνδρου γίνεται με δύο τρόπους :
  - + Διάμεση αύξηση (χονδροκύτταρα)
  - + Αποθετική (χονδροβλάστες)

# ΧΟΝΔΡΟΣ

- ✗ Ο ώριμος υαλοειδής χόνδρος μπορεί να χωριστεί σε 4 ζώνες :
  - + Την επιφανειακή
  - + Τη μεταβατική
  - + Την ακτινωτή
  - + Την αποτιτανωμένη
- ✗ Ο χόνδρος δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία οπότε η ανταλλαγή μεταβολιτών γίνεται με την διάχυση ουσιών διαμέσου των ενυδατωμένων γλυκοζαμινοκλυκανών

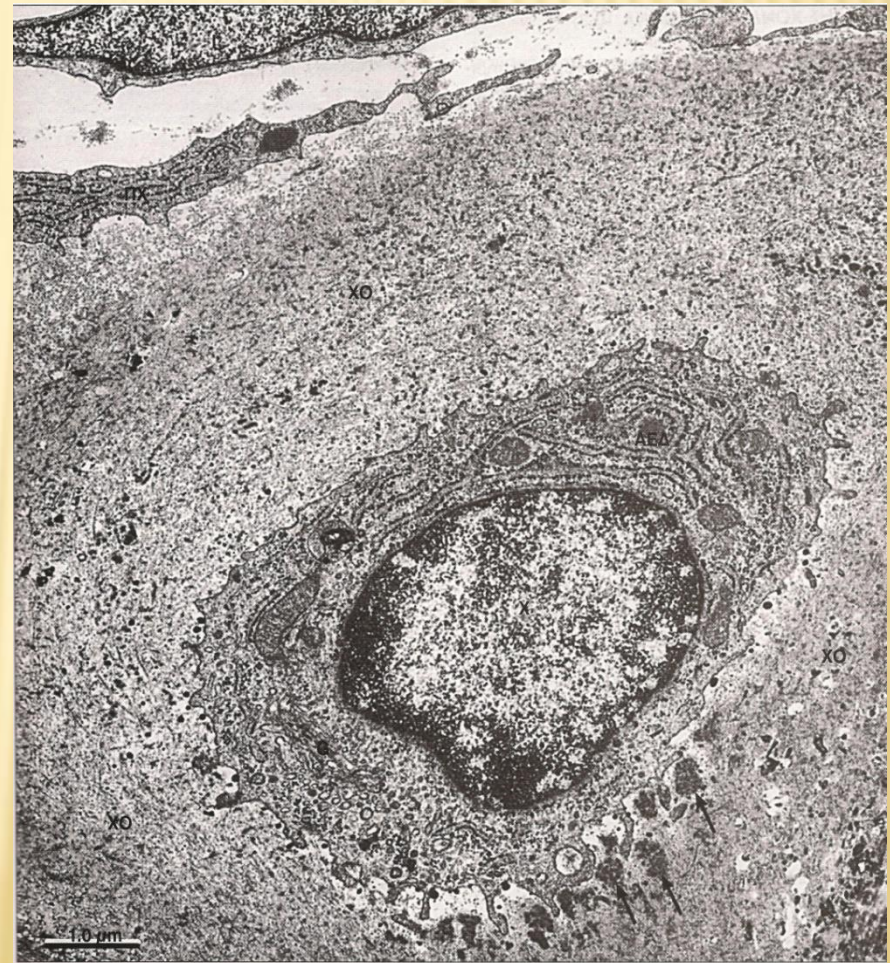


Εικόνα 10.1. Υαλοειδής χόνδρος (Α) Χρώση Α-Η x 150 (Β) Λεπτή τομή, κυανό της τολουιδίνης x 1200.



# ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

- ✖ Η ακεραιότητα της εξωκυττάριας ουσίας εξαρτάται από τα χονδροκύτταρα
- ✖ Επεκτεινόμενα από την εσωτερική ζώνη προς την εξωτερική επιφάνεια του χόνδρου, τα χονδροκύτταρα είναι προοδευτικά λιγότερο διαφοροποιημένα
- ✖ Τα χονδροκύτταρα της εσωτερικής ζώνης είναι οργανωμένα σε ομάδες των 2 ή 4 χονδροκυττάρων



Εικόνα 10.2. Χονδροκύτταρα (ΗΜ x 16000).

# ΘΕΜΕΛΙΑ ΟΥΣΙΑ

- ✖ Στους χόνδρους η θεμέλια ουσία αποτελείται από :
  - + Κολλαγόνο τύπου 2
    - ✖ Αποτελεί 50-60% του ξηρού βάρους του χόνδρου
  - + Γλυκοζαμινογλυκάνες
    - ✖ Μεγάλος όγκος σε σχέση με τη μάζα (μη εύκαμπτα μόρια)
    - ✖ Υδρόφιλες (έντονα αρνητικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες)
    - ✖ Βασεόφιλες
- ✖ Στον ώριμο χόνδρο το 80% του βάρους του αποτελείται από νερό και άλατα και το υπόλοιπο από το κολλαγόνο τύπου 2 και τις γλυκοζαμινογλυκάνες



# ΑΡΘΡΩΣΕΙΣ

✖ Οι αρθρώσεις ταξινομούνται σε δύο ομάδες :

+ Τις Διαρθρώσεις

- ✖ Μεγάλη κινητικότητα
- ✖ Συγροτούνται με συνδέσμους
- ✖ Λιπαίνονται με αρθρικό υγρό
- ✖ Σε μερικές περιπτώσεις μεταξύ των αρθρικών επιφανειών παρεμβάλλονται ινοχόνδρινοι δίσκοι (Μηνίσκος)

+ Τις Συναρθρώσεις

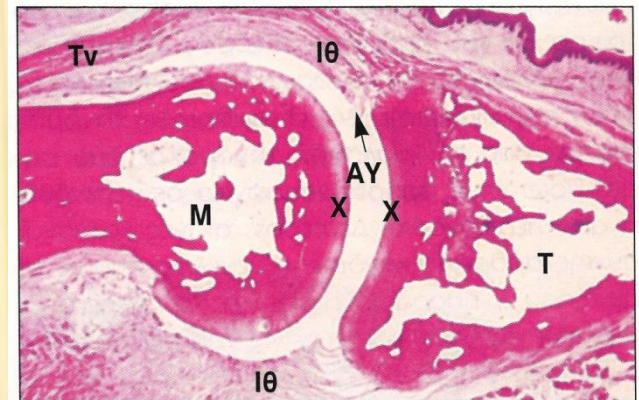
- ✖ Περιορισμένη κινητικότητα
- ✖ Τα αρθρούμενα οστά ενώνονται μεταξύ τους με πυκνό κολλαγονώδη ιστό



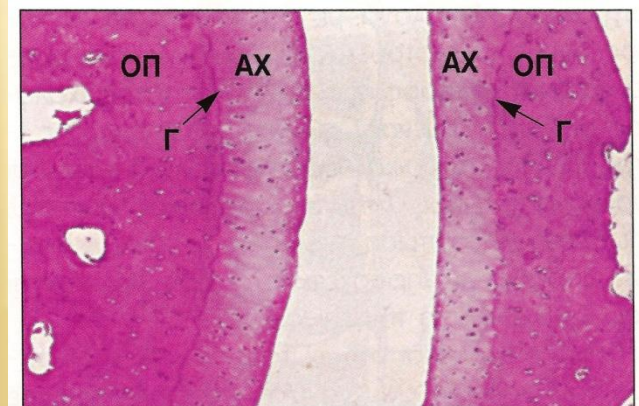
# ΔΙΑΡΘΡΩΣΕΙΣ

## ✗ Άπω μεσοφαλαγγική άρθρωση του δακτύλου του άνω άκρου

- + Τελική φάλαγγα (Τ)
  - + Μεσαία φάλαγγα (Μ)
  - + Υαλοειδής Χόνδρος (Χ)
  - + Ινώδης θύλακας (ΙΘ)
  - + Αρθρικός υμένας (ΑΥ)
- 
- + Οστεινη τελική πλάκα (ΟΠ)
  - + Αρθρικός χόνδρος (ΑΧ)
  - + Υλικό πλούσιο σε γλυκοπρωτεΐνη (Γ)



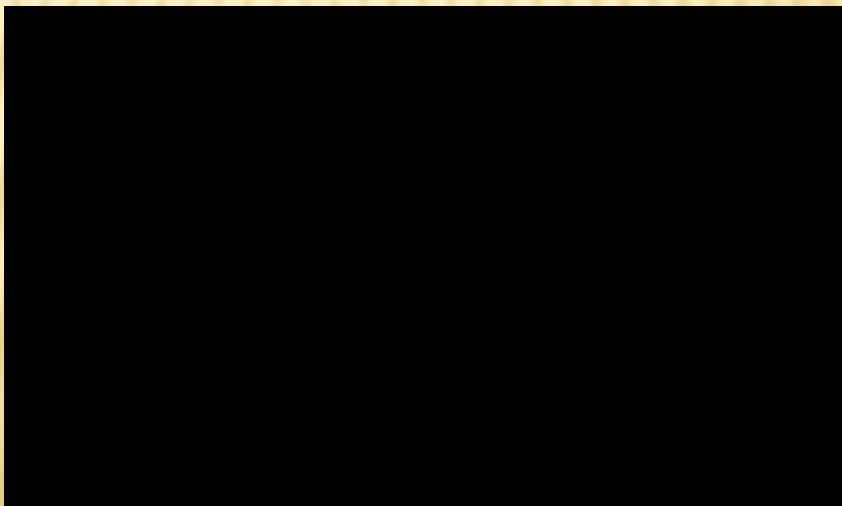
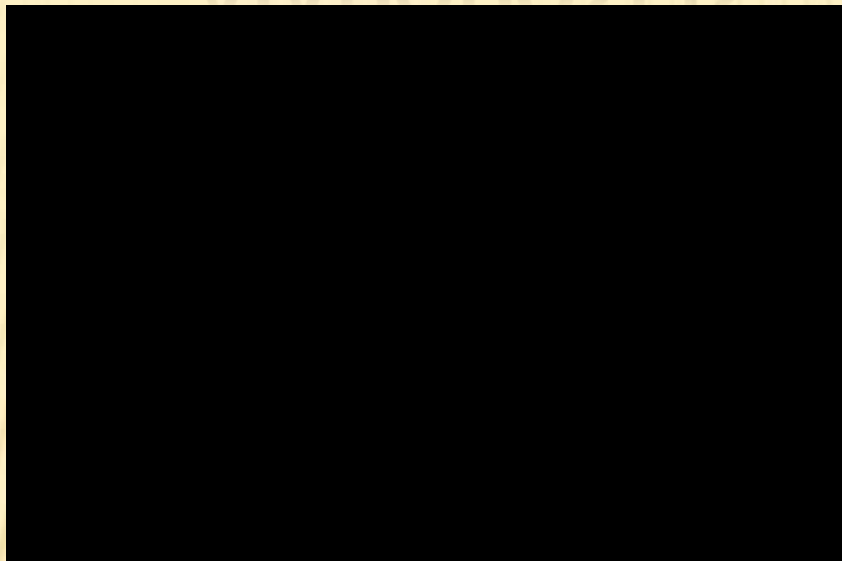
Εικόνα 10.24. Διάρθρωση (Πίθηκος: Χρώση Α - Η x 12).



Εικόνα 10.25. Αρθρικός χόνδρος (Χρώση Α - Η x 20).

# ΔΙΑΡΘΡΩΣΕΙΣ

---



# ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

---

- ✖ Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση αρθροπαθειών είναι :
  - + Προδιαθεσικοί παράγοντες
    - ✖ Ηλικία, φύλο, βάρος
  - + Ενδογενείς παράγοντες
    - ✖ Γενετικοί, ανοσοβιολογικοί, μεταβολικοί
  - + Εξωγενείς παράγοντες
    - ✖ Μηχανικοί, χημικοί (κορτιζόνη)

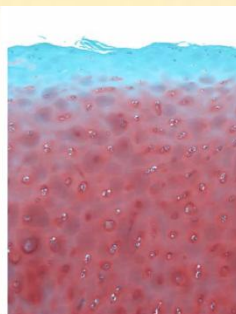
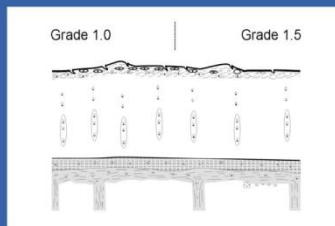


# ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

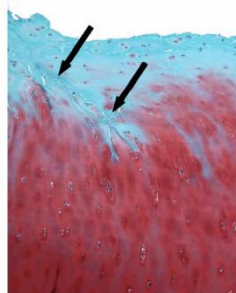
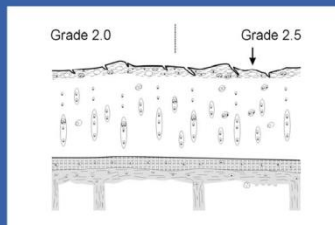
- ✘ Η εκτίμηση της εικόνας του ιστού γίνεται με βάση το σύστημα OARSI Scoring System που προτάθηκε το 2005 από την International Cartilage Repair Society
- ✘ Η αξιολόγηση του ιστού γίνεται με βάση το βαθμό και το στάδιο στο οποίο έχει επεκταθεί η ΟΑ. Όπου ο βαθμός(0-6) αναφέρεται στο βάθος που έχει φτάσει εκφύλιση του ιστού, ενώ το στάδιο(0-4) στην επιφανειακή έκταση. Γνωρίζοντας το βαθμό και το στάδιο μπορούμε να βγάλουμε το συνολικό βαθμό παθογένειας του ιστού.

# ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ (ΒΑΘΜΟΣ)

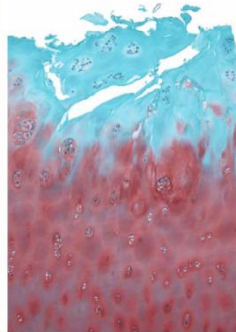
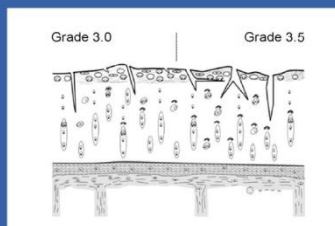
Grade 1  
Surface intact



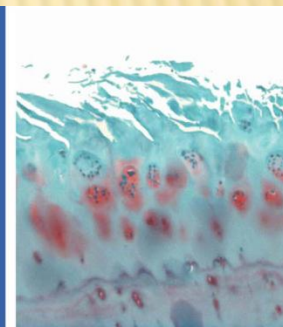
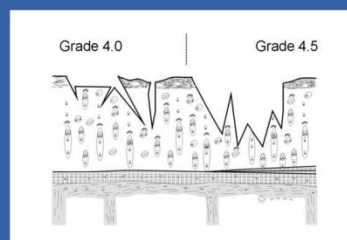
Grade 2  
Surface Discontinuity



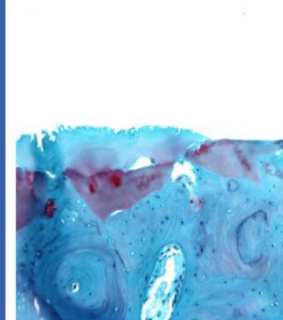
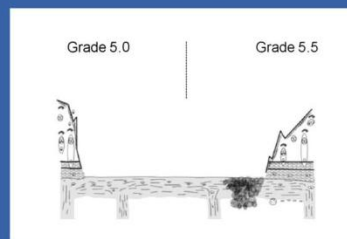
Grade 3  
Vertical Fissures



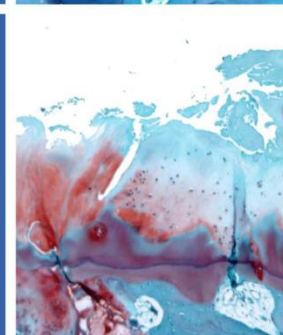
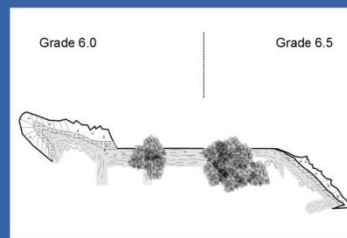
Grade 4  
Erosion



Grade 5  
Denudation



Grade 6  
Deformation



# ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ (ΣΤΑΔΙΟ-ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΒΑΘΜΟΣ)

Table IV  
*OA cartilage histopathology—stage assessment*

Stage	% Involvement (surface, area, volume)
Stage 0	No OA activity seen
Stage 1	< 10%
Stage 2	10–25%
Stage 3	25–50%
Stage 4	> 50%

Stage = extent of joint involvement.

Table V  
*OA score—semi-quantitative method*

Grade	Stage			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

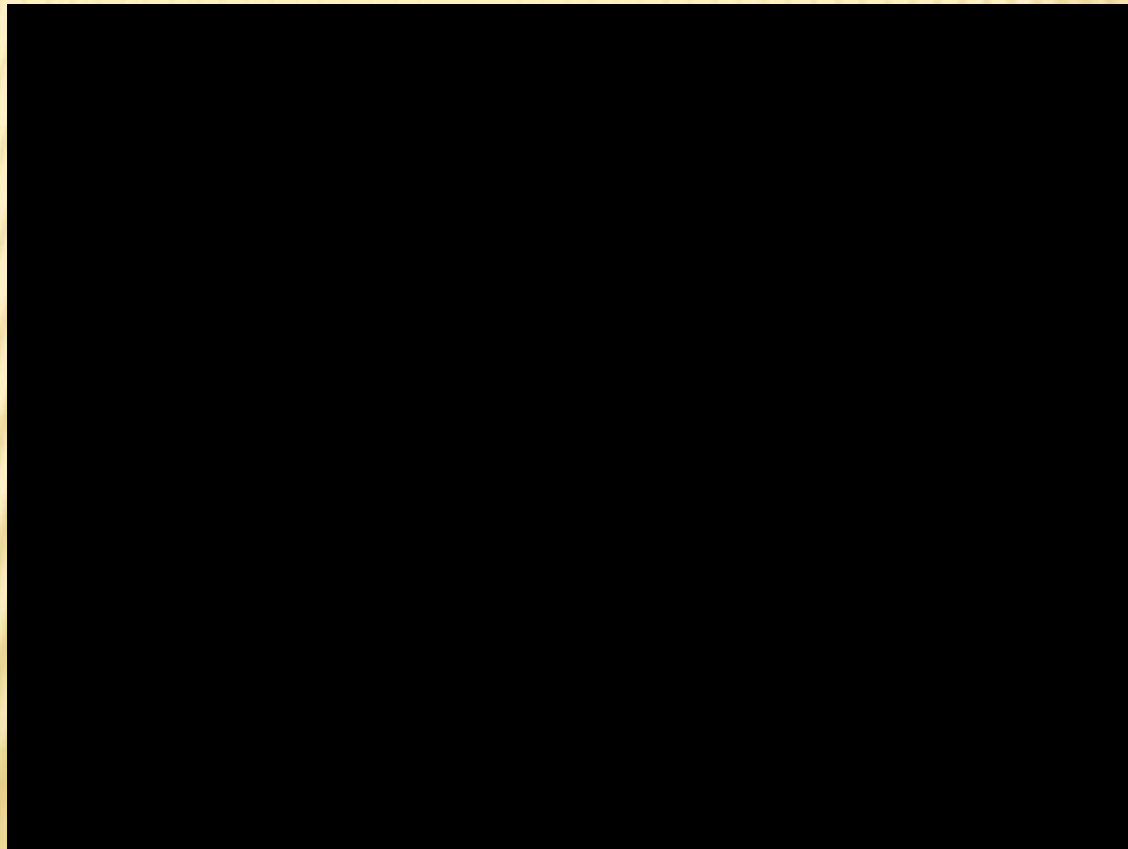
Score = grade  $\times$  stage.



# ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

---

- ✖ Απουσία μηνίσκου (καταπόνηση)



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ)

## ✖ Μονιμοποίηση

- + Βάζουμε τον ιστό σε διάλυμα φορμόλης συγκέντρωσης 10% σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες
- + Σε περίπτωση που έχει οστό πρέπει να γίνει αφαίρεση του ασβεστίου με όξινο διάλυμα για 6 έως 12 ώρες
- + Εμβάπτιση σε νερό από 30 λεπτά έως 1 ώρα
- + Φυλάσσουμε τον ιστό σε διάλυμα 70% αιθανόλη

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ)

## ✖ Αφυδάτωση

1. Αιθανόλη 70% 1 ώρα
2. Αιθανόλη 96% 30 λεπτά x3
3. Αιθανόλη 100% 30 λεπτά x3

## ✖ Διαύγηση

1. Ξυλόλη 1 ώρα x2

## ✖ Σκλήνωση

1. Εμπότιση του ιστού σε παραφίνη στους 58° για 1 ώρα x2



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ)

## ✕ Έγκλειση

1. Τοποθέτηση λιωμένης παραφίνης σε θερμή πλάκα
2. Αφου κρυώσει λίγο (~2 sec) τοποθετώ τους ιστούς
3. Τοποθετώ πάνω από την πλάκα την κασετίνα συγκράτησης και προσθέτω παραφίνη
4. Όταν κρυώσει παίρνω την κασετίνα με τον ιστό



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΤΟΜΗ)

## ✖ Τομή :

1. Τοποθετούμε την κασετίνα στο μικροτόμο
2. Ρυθμίζουμε την απόσταση της λεπίδας από την κασετίνα όσο πιο κοντά γίνεται χωρίς να ακουμπήσουν
3. Ρυθμίζουμε το βήμα κοπής συνήθως 3, 5, 7  $\mu\text{m}$
4. Γυρίζοντας το χειρομοχλό κινούμε την κασετίνα για να κόψουμε τομές με την λεπίδα
5. Παίρνουμε τις τομές που είναι τυλιγμένες και τις τοποθετούμε στο θερμό λουτρό έτσι ώστε να 'ανοίξουν'
6. Τις μαζεύουμε με τις αντικειμενοφόρες πλάκες (α.π.)

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΤΟΜΗ)



Κουρδιστήρι

Θέση Κασετίνας

Χειρομοχλός

Λεπίδα

Ρύθμιση  
πάχους κοπής



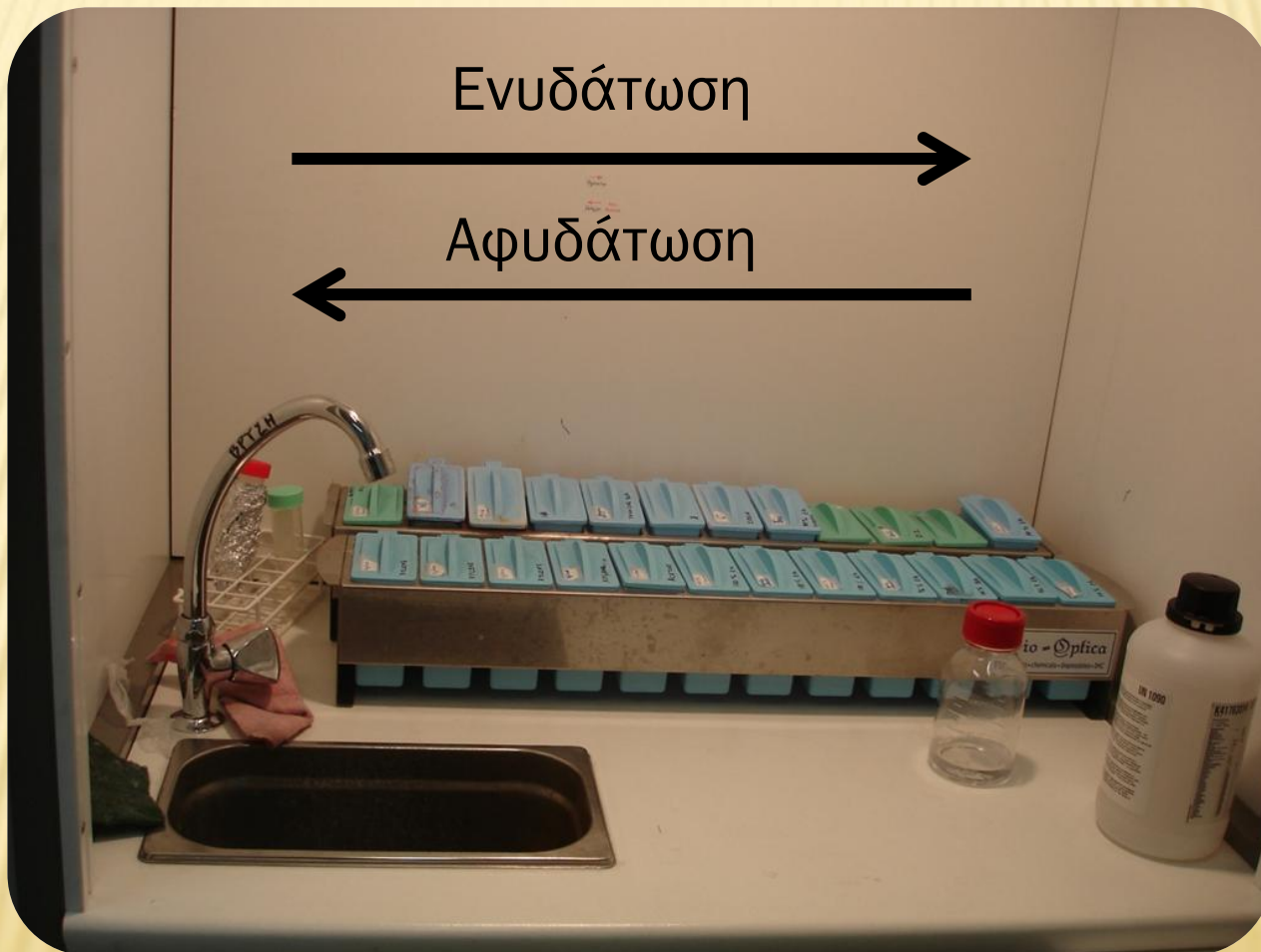


# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΧΡΩΣΗ)

## ✖ Χρώση :

1. Ζεστάνναμε τις α.π. για 30 λεπτά στον κλίβανο στους 65° C
2. Αφαίρέσαμε την παραφίνη από τον ιστό με 4 διαδοχικά μπάνια σε Ξυλόλη για 3 λεπτά το καθένα(5 λεπτά).
3. Ενυδάτωσαμε τον ιστό με την παρακάτω διαδικασία :
  - ✖ Αρχικά ένα ξέβγαλμα σε Acetone
  - ✖ Αιθανόλη 100% για 2.5 λεπτά x3
  - ✖ Αιθανόλη 96% για 2.5 λεπτά x3
  - ✖ Αιθανόλη 70% για 2.5 λεπτά x1
  - ✖ Αιθανόλη 50% για 2.5 λεπτά x1
  - ✖ Εμβάπτιση σε αποσταγμένο νερό για 10 λεπτά

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΧΡΩΣΗ)

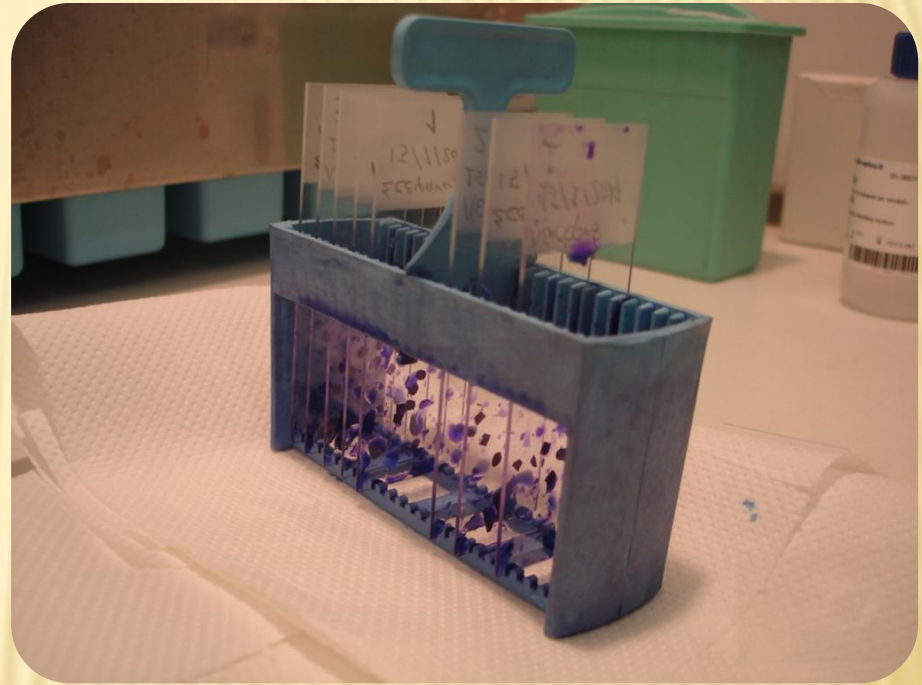


# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΧΡΩΣΗ)

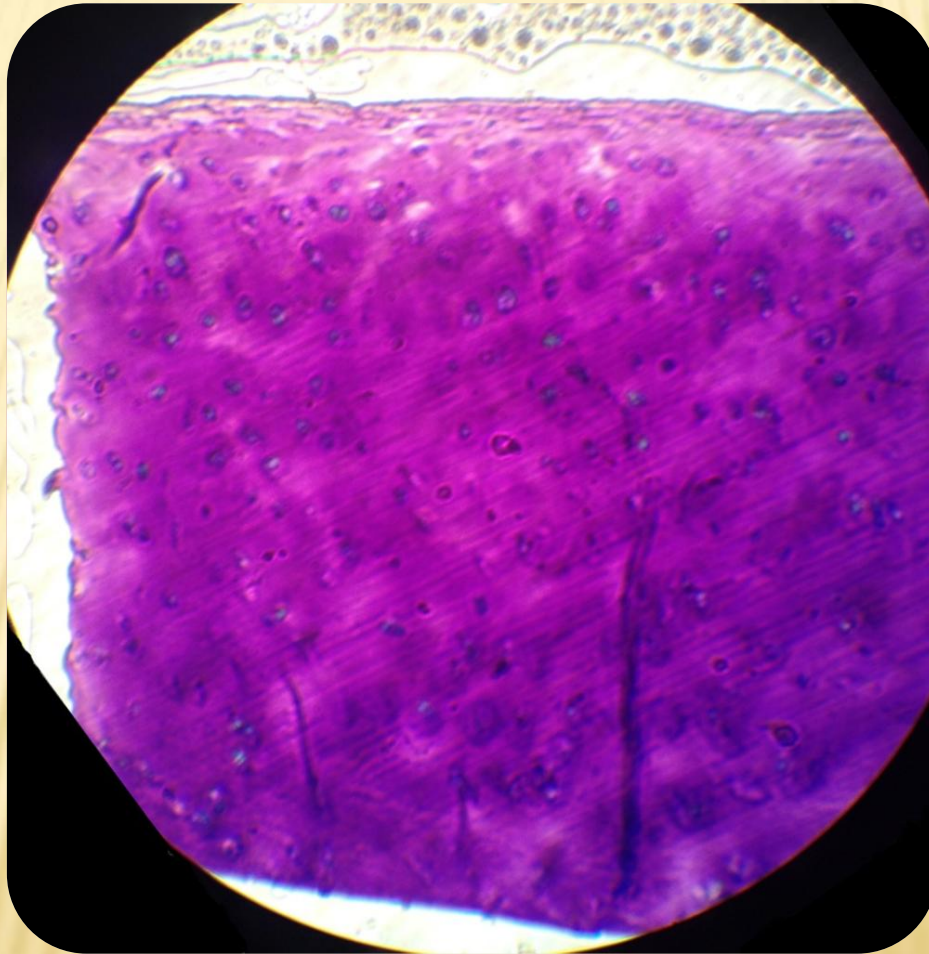
4. Εμβαπτίζουμε τις α.π. σε διάλυμα 0.25 % βάρος κατ' όγκο κυανό της τολουϊδίνης για 2 λεπτά
5. Ξέπλυμα σε αποσταγμένο νερό
6. Γρήγορη αφυδάτωση : 10 δευτερόλεπτα σε κάθε διάλυμα αιθανόλης ( 50%, 70%, 96%, 100%)
7. Εμβάπτιση σε Ξυλόλη για 5 λεπτά
8. Ξήρανση με αέρα των α.π. για 20 λεπτά
9. Καλύπτουμε τις α.π. με καλυπτρίδες βάζοντας ανάμεσα μια συνθετική ρητίνη που έχει βάση την Ξυλόλη



# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ (ΧΡΩΣΗ)



# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



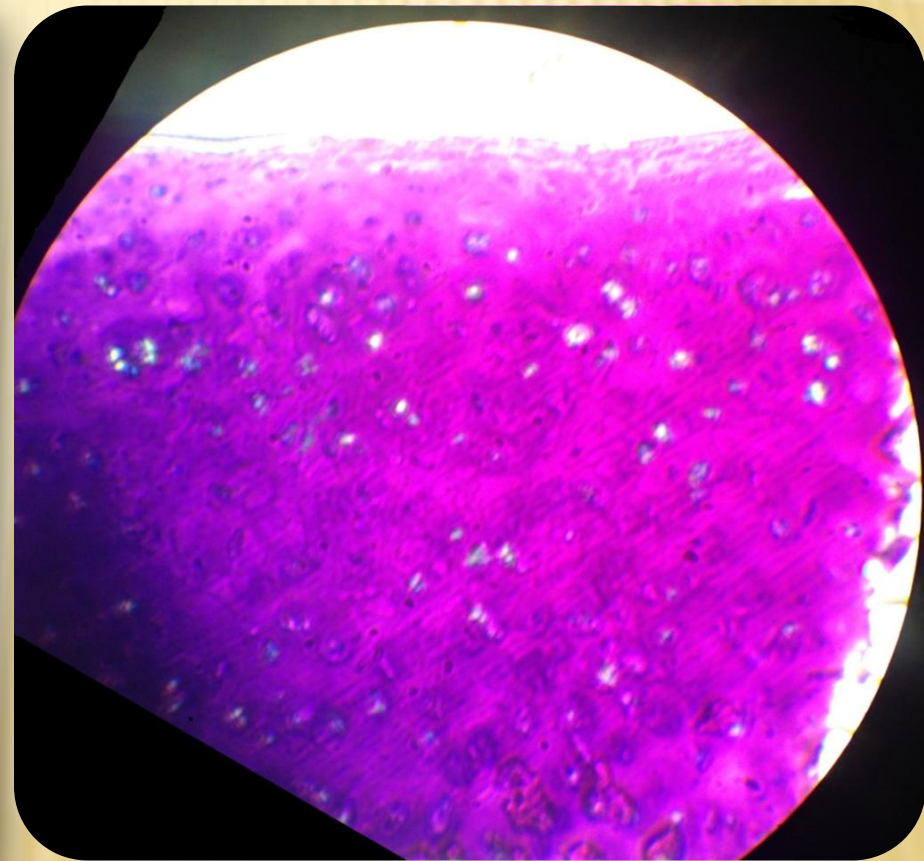
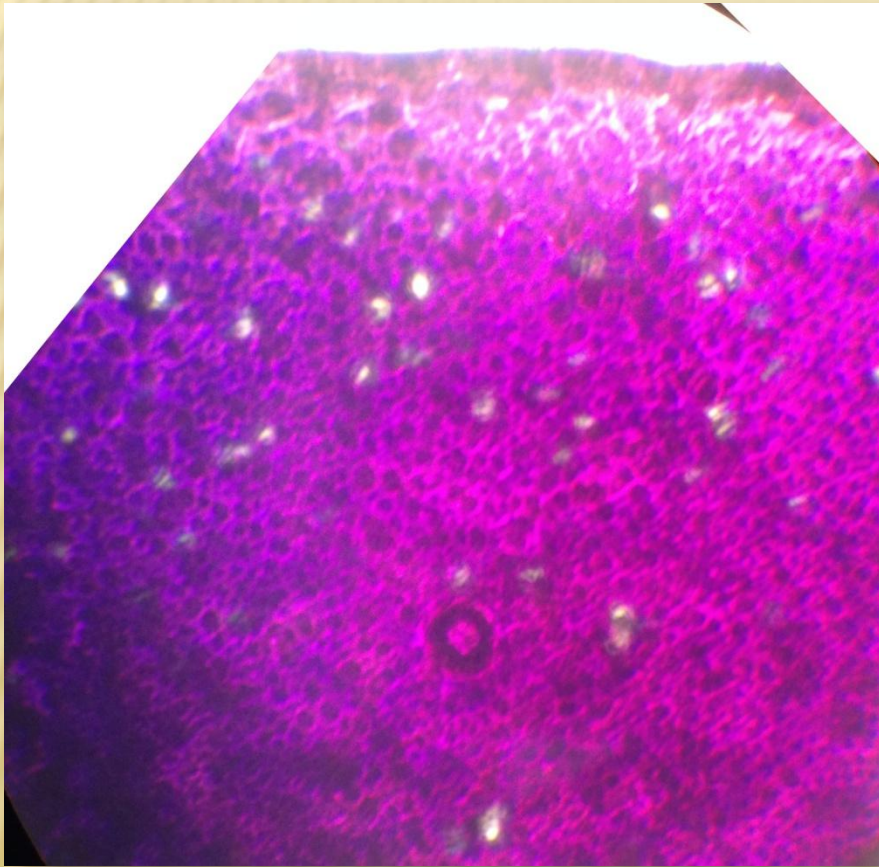


# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ





# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η ιστολογία είναι ένας σημαντικός κλάδος της βιοϊατρικής καθώς με την μελέτη των ιστών και την διάκριση των διαφορών συστατικών τους μπορούμε :

- ✖ να κατανοήσουμε την δομή των ιστών.
- ✖ να δουμε σε τι κατάσταση βρίσκεται ο ιστός των διάφορων οργάνων, και κατά πόσο έχει επεκταθεί η ασθένεια από την οποία έχει προσβληθεί ( οστεοαρθρίτιδα ).
- ✖ Να διαγνώσουμε αν έχουν προσβληθεί τα κύτταρα που περικλείουν τον καρκινικό όγκο που έχει αφαιρεθεί.



# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

- ✖ τοποθέτηση του ιστού σε κλίβανο υπό συνθήκες κενού (ειδικά όταν έχουμε και οστό στο δείγμα μας) κατά την διαδικασία της διάυγασης.
- ✖ Υδατολουτρό κάτω από τον μικροτόμο ώστε να πέφτουν οι τομές μας και να τις παίρνουμε αμέσως.
- ✖ Διαφανή δοχεία κατά την διαδικασία της μονιμοποίησης , της αφυδάτωσης και της διαύγασης, για να έχουμε την δυνατότητα παρατήρησης του ιστού.
- ✖ Ομοιόμορφη κάλυψη της ρητίνης σε όλη την επιφάνεια του ιστού και γύρω από αυτόν.



# ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΜΩΝ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



---

Ευχαριστούμε